

**CHIMERIC ADENOVIRAL VECTORS**

Patent Number: WO9961638  
Publication date: 1999-12-02  
Inventor(s): LUSKY MONIKA (DE); MEHTALI MAJID (FR); WINTER AREND JAN (FR)  
Applicant(s): LUSKY MONIKA (DE); MEHTALI MAJID (FR); TRANSGENE SA (FR); WINTER AREND JAN (FR)  
Requested Patent: ☐ WO9961638  
Application Number: WO1999FR01238 19990527  
Priority Number(s): FR19980006654 19980527  
IPC Classification: C12N15/86; C12N5/10; A61K48/00  
EC Classification: C12N15/86F  
Equivalents: AU3832699, ☐ EP1002120 (WO9961638)

---

**Abstract**

---

The invention concerns adenoviral vectors having the characteristic of containing a region essential for heterologous packaging with respect to the adenoviral genome from which they are derived. The invention also concerns a method for making a viral preparation containing said adenoviral vectors, a cell, a pharmaceutical composition or material comprising them and their therapeutic or prophylactic use. Finally, the invention concerns an adenoviral genome of animal origin having attenuated packaging properties with respect to the native genome from which it is derived.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/61638</b> <b>(43) Date de publication internationale: 2 décembre 1999 (02.12.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/01238 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 27 mai 1999 (27.05.99)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/06654 27 mai 1998 (27.05.98) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, impasse de Reims, F-67000 Illkirch-Graffenstaden (FR). LUSKY, Monika [DE/DE]; Kappellenweg 18, D-07910 Freiburg (DE). WINTER, Arend, Jan [NL/FR]; 15, rue de la Ménagerie, F-67100 Strasbourg (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title: CHIMERIC ADENOVIRAL VECTORS</b> <b>(54) Titre: VECTEURS ADENOVIRAUX CHIMERES</b> <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns adenoviral vectors having the characteristic of containing a region essential for heterologous packaging with respect to the adenoviral genome from which they are derived. The invention also concerns a method for making a viral preparation containing said adenoviral vectors, a cell, a pharmaceutical composition or material comprising them and their therapeutic or prophylactic use. Finally, the invention concerns an adenoviral genome of animal origin having attenuated packaging properties with respect to the native genome from which it is derived.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne des vecteurs adénoviraux qui présentent la caractéristique de contenir une région essentielle à l'encapsulation hétérologue par rapport au génome adénoviral dont ils dérivent. Elle a également pour objet un procédé pour préparer une préparation virale contenant lesdits vecteurs adénoviraux, une cellule, une composition pharmaceutique ou de matière les comprenant ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. Enfin, la présente invention a également trait à un génome adénoviral d'origine animale présentant des capacités d'encapsulation atténuées par rapport au génome natif dont il dérive.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	CN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

- 1 -

## VECTEURS ADENOVIRAUX CHIMERES

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs adénoviraux qui présentent la caractéristique de contenir une région essentielle à l'encapsidation hétérologue par rapport au génome adénoviral dont ils dérivent. Ces vecteurs peuvent être utilisés à titre de vecteurs auxiliaires ou recombinants, les premiers permettant la propagation des seconds. L'invention a également pour objet un procédé pour préparer une préparation virale contenant lesdits vecteurs adénoviraux, une cellule, une composition pharmaceutique ou de matière les comprenant ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. Enfin, la présente invention a également trait à un génome adénoviral d'origine animale présentant des capacités d'encapsidation atténuées par rapport au génome natif dont il dérive. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique dans une cellule ou un organisme hôte. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de cette technologie pour diverses maladies aussi bien génétiques (dans le but de corriger le dysfonctionnement d'un gène défectueux) qu'acquises (cancers, maladies infectieuses comme le SIDA...). La plupart des stratégies actuelles utilisent des vecteurs pour véhiculer le gène thérapeutique vers sa cible cellulaire. De nombreux vecteurs tant viraux que synthétiques ont été développés au cours de ces dernières années et ont fait l'objet de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier.

L'intérêt des adénovirus à titre de vecteurs de thérapie génique a déjà été

évoqué dans de nombreux documents de l'art antérieur. Ils infectent de nombreux types cellulaires, aussi bien des cellules en division que quiescentes, sont non intégratifs et peu pathogènes. En outre, ils possèdent un tropisme naturel pour les voies respiratoires. Ces propriétés particulières font des adénovirus des vecteurs de choix pour de nombreuses applications thérapeutiques et même vaccinales. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb qui porte une trentaine de gènes intervenant dans le cycle viral. Les gènes précoces (E1 à E4 ; E pour early en anglais) sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome. Les régions E1, E2 et E4 sont essentielles à la replication virale alors que la région E3 impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire anti-adénovirus chez l'hôte ne l'est pas. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) codent majoritairement pour les protéines de structure et recouvrent en partie les unités de transcription précoces. Ils sont pour la plupart transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais). En outre, le génome adénoviral porte à ses extrémités des régions agissant *en cis* essentielles à l'encapsidation constituées de séquences terminales inversées (ITR) situées aux extrémités 5' et 3' et d'une région d'encapsidation qui suit l'ITR 5'.

Les vecteurs adénoviraux actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont dépourvus de la majeure partie de la région E1 afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. Des délétions supplémentaires dans la région E3 permettent d'accroître les capacités de clonage. Les gènes d'intérêt sont introduits dans l'ADN viral à la place de l'une ou l'autre région délétée. Si la faisabilité du transfert de gènes en utilisant ces vecteurs dits de première génération est maintenant bien établie, la question de leur innocuité reste posée. Outre le risque de générer des particules compétentes pour la replication, l'immunogénécité potentielle des protéines virales encore exprimées peut dans certaines applications particulières s'opposer à la persistance des cellules transduites et à l'expression stable du transgène. Ces inconvénients ont justifié la construction de vecteurs de nouvelles

génération. Ils conservent les régions *en cis* (ITRs et séquences d'encapsidation) essentielles à l'encapsidation mais comportent des modifications génétiques supplémentaires visant à supprimer l'expression *in vivo* de l'essentiel des gènes viraux (voir par exemple la demande internationale WO94/28152). A cet égard, un vecteur  
5 dit minimal, déficient pour l'ensemble des fonctions adénovirales représente une alternative de choix.

Les techniques de préparation des vecteurs adénoviraux sont largement décrites dans la littérature. Dans un premier temps, le génome est constitué par recombinaison homologe dans la lignée 293 (voir notamment Graham et Preveet,  
10 1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed E. J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ) ou dans *Escherichia coli* (voir par exemple la demande internationale WO96/17070). Il est ensuite nécessaire de propager le vecteur afin de constituer un stock de particules virales le contenant. Cette étape de production est critique et doit permettre d'atteindre des titres élevés en  
15 particules infectieuses pour pouvoir envisager un développement à grande échelle en vue de la préparation de lots cliniques. On utilise à cet effet des lignées de complémentation fournissant *en trans* les produits d'expression viraux pour lesquels le vecteur est defectif. Par exemple, les virus délétés de E1 peuvent être propagés dans la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al.,  
20 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Pour ce qui est des vecteurs de seconde génération, on peut avoir recours à des lignées complémentant deux fonctions virales essentielles, telles que celles décrites par Yeh et al. (1996, J. Virol. 70, 559-565), Krougliak et Graham (1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586), Wang et al. (1995 Gene Therapy 2, 775-783), Lusky et al. (1998, J. Virol. 72, 2022-2033) et dans les  
25 demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119. Du fait de la toxicité potentielle des produits d'expression viraux, ces lignées nécessitent d'être optimisées en terme de capacité de croissance et rendement en particules virales, avant d'envisager leur mise en oeuvre dans un processus industriel. De plus, une lignée

complémentant l'ensemble des fonctions adénovirales adaptée à la propagation des vecteurs minimaux n'est à l'heure actuelle pas encore disponible.

Une autre alternative repose sur l'emploi d'un élément viral supplémentaire, désigné "virus auxiliaire" pour compléter au moins en partie les fonctions  
5 défectives d'un vecteur adénoviral recombinant. Les virus auxiliaires de l'art antérieur consistent en un génome adénoviral, éventuellement délété d'une région essentielle pour laquelle le vecteur recombinant ne nécessite pas de complémentation. A titre d'exemple, la co-transfection dans la lignée 293 d'un virus auxiliaire E1<sup>-</sup> et d'un vecteur adénoviral recombinant E1<sup>-</sup> E4<sup>-</sup> conduit à la formation de particules virales de  
10 vecteur recombinant. La fonction E1 est fournie par la lignée 293 et la fonction E4 par le virus auxiliaire.

Cependant, un inconvénient majeur de cette méthode est que les cellules produisent une population mixte de particules virales, les unes comportant le vecteur recombinant et les autres le vecteur auxiliaire. En pratique, les préparations  
15 contiennent majoritairement des particules virales auxiliaires, celles-ci présentant un avantage sélectif, de sorte que la contamination peut atteindre et même dépasser 90%. La présence du virus auxiliaire n'est pas souhaitable dans le cadre d'une thérapie appliquée à l'homme et, de ce fait, nécessite la mise en oeuvre de techniques physiques de séparation, telles que l'ultracentrifugation.

20 La présente invention se propose d'exploiter les propriétés de croissance respectives des adénovirus humains et animaux. On a maintenant mis en évidence l'incapacité des adénovirus bovins BAV3 à se propager dans une lignée humaine alors que l'Ad5 peut être propagé dans des cellules bovines. En effet, l'infection d'adénovirus BAV3 seuls ou en présence d'Ad5 dans la lignée humaine 293 ne  
25 conduit pas à la formation de particules virales infectieuses BAV3. Par contre des virions Ad5 sont obtenus par infection d'une lignée bovine. En outre, il n'y a pas d'expression des protéines virales BAV3 dans les cellules humaines.

Sur la base de ces observations, la présente invention propose notamment un système d'encapsulation se déroulant en deux étapes et mettant en oeuvre des adénovirus chimères entre l'Ad5 et BAV3. On a maintenant construit (i) un vecteur auxiliaire dérivé d'un génome Ad5 dans lequel la région d'encapsulation native est  
5 remplacée celle de l'adénovirus bovin BAV3 et (ii) un vecteur adénoviral défectif recombinant dérivant d'un Ad5 et comprenant deux régions d'encapsulation, la première d'origine Ad5 (autologue) et la seconde d'origine BAV3 (hétérologue). La transfection des deux vecteurs dans une lignée cellulaire bovine infectée par un adénovirus BAV3 conduit à l'amplification des trois génomes viraux et à la  
10 production de particules virales des trois types. Au cours de cette première étape d'amplification, le génome BAV3 fournit les facteurs agissant *en trans* permettant l'encapsulation des vecteurs recombinant et auxiliaire et ce dernier complète au moins en partie les fonctions déficientes du vecteur recombinant. Le mélange des trois types de virus est récupéré des cellules bovines et utilisé pour infecter des cellules  
15 humaines 293. Le génome BAV3 et le vecteur auxiliaire possédant uniquement une région d'encapsulation dérivée de BAV3 ne peuvent pas se propager dans la lignée humaine même en présence d'Ad5 du fait de l'absence des facteurs d'encapsulation reconnaissant les séquences BAV3, ce qui exclut la formation de particules virales correspondantes. Néanmoins, le vecteur auxiliaire peut produire *en trans* les facteurs  
20 nécessaires à l'encapsulation du vecteur recombinant médiée par le signal d'encapsulation d'origine Ad5 et compléter, en association avec les cellules 293, les fonctions précoces et tardives déficientes, dans le but de générer de façon majoritaire des virions contenant le vecteur recombinant. La présente invention répond à des objectifs de sécurité en réduisant considérablement la contamination des  
25 préparations adénovirales par les vecteurs auxiliaires et évite ainsi la mise en oeuvre de techniques de séparation longues, coûteuses et d'efficacité variable.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur adénoviral dérivant d'un génome adénoviral caractérisé en ce qu'il comprend une région



essentielle à l'encapsidation hétérologue par rapport au génome adénoviral dont il dérive.

Au sens de la présente invention, un vecteur adénoviral est obtenu à partir d'un adénovirus parental dont le génome est modifié. Une modification minimale est  
5 l'insertion d'une région essentielle à l'encapsidation d'une origine différente (hétérologue). Bien entendu, d'autres modifications peuvent également être envisagées. Celles-ci peuvent être diverses (délétion, addition, substitution d'un ou plusieurs nucléotides) et localisées au sein des régions codantes du génome adénoviral ou en dehors de celles-ci (régions impliquées dans l'expression des gènes viraux, dans  
10 l'encapsidation....) et touchées aussi bien les régions précoces que tardives. A cet égard, un vecteur adénoviral particulièrement adapté à la présente invention est déficient, c'est à dire incapable de se propager de façon autonome dans une cellule hôte en l'absence de complémentation. Il peut être déficient pour un ou plusieurs gènes viraux essentiels à la réplication. Ces gènes peuvent être délétés (en totalité ou en  
15 partie), rendus non fonctionnels (par exemple par mutation) ou substitués par d'autres séquences (notamment par un gène d'intérêt dont l'expression est recherchée dans une cellule ou un organisme hôte).

Le vecteur adénoviral de la présente invention peut dériver d'un adénovirus humain ou animal et d'un sérotype quelconque. Les adénovirus humains du sous  
20 groupe C et notamment les adénovirus 2 (Ad2) et 5 (Ad5) conviennent tout particulièrement à la mise en oeuvre de l'invention. Parmi les adénovirus animaux utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les adénovirus canins, aviaires, bovins, murins, ovins porcins, simiens...etc. A titre illustratif, on peut employer les adénovirus murins Mav1 (Beard et al., 1990, *Virology* 175, 81-90),  
25 canins CAV-1 ou CAV-2 (Spibey et Cavanagh, *J. Gen. Virol.*, 1989, 70, 165-172; Linné, 1992, *Virus Research* 23, 119-133 ; Shibata et al., 1989, *Virol.* 172, 460-467; Jouvenne et al., *Gene*, 1987, 60, 21-28), aviaires DAV (Zakharchuk et al., *Arch.*

Virol., 1993, 128, 171-176) ou encore bovins BAV3 (Mittal et al., J. Gen. Virol., 1995, 76, 93-102). D'une manière générale, les adénovirus précités sont disponibles dans les collections et notamment à l'ATCC et ont fait l'objet de nombreuses études publiées dans l'art antérieur. Concernant l'adénovirus 5 (Ad5), il convient de noter  
5 que la séquence complète de son génome est disponible auprès de GenBank sous le numéro d'accès M73260. Cette séquence est intégralement incorporée par référence dans la présente demande.

Aux fins de la présente invention, par "région essentielle à l'encapsidation", on entend une région agissant *en cis* pour assurer, en collaboration avec des facteurs  
10 protéiques notamment viraux, l'encapsidation d'un génome de vecteur viral dans une capsid virale. De telles régions consistent notamment, dans le cas du génome adénoviral, en les ITR 5' et 3', et la région d'encapsidation. Ces termes sont bien connus dans le domaine de l'art considéré.

La caractéristique du vecteur adénoviral selon l'invention est qu'il porte une  
15 région essentielle à l'encapsidation hétérologue c'est à dire d'une origine différente par rapport à l'adénovirus parental. Bien que celle-ci puisse être issue d'un virus quelconque (rétrovirus, poxvirus...etc), on préfère une origine adénovirale dès lors qu'il s'agit d'un adénovirus de genre ou sérotype différent de l'adénovirus parental. De manière préférée, selon la présente invention, ladite région essentielle à  
20 l'encapsidation hétérologue consiste en la séquence d'encapsidation et éventuellement en l'un au moins des ITR 5' et 3'.

Selon l'origine de l'adénovirus, les régions essentielles à l'encapsidation peuvent varier quelque peu. Néanmoins, elles peuvent être identifiées sur la base des données de séquence disponibles ou par analogie avec les adénovirus humains. Les  
25 ITR sont naturellement localisés aux extrémités 5' et 3' du génome adénoviral et sont impliqués dans les étapes de réplication et d'encapsidation dudit génome. Généralement, les ITR comportent entre 100 et 200 paires de bases. De nombreuses

séquences d'ITR sont proposées par la littérature, citons à titre d'exemple Hearing et al., 1987, *J. Virol.*, 61, 2555-2558 pour l'Ad5 ou WO 95/16048 pour BAV3. La région d'encapsidation (notée  $\Psi$ ) est localisée à la suite de l'ITR 5' du génome adénoviral et comporte des motifs redondants qui participent à l'encapsidation. Par exemple, celle de l'Ad5 comporte 7 motifs désignés AI à AVII de séquence consensus 5' A/T AN A/T TTTG 3' (où N représente un nucléotide quelconque) et situés aux positions 241-248, 262-269, 304-311, 314-321 et 339-346 du génome viral (Grable et Hearing, 1990, *J. Virol.* 64, 2047-2056; Schmid et Hearing, 1998, *J. Virol.* 72, 6339-6347). Les régions d'encapsidation de divers adénovirus sont décrites dans la littérature (voir par exemple Hammarskjold et Winberg, 1980, *Cell* 20, 787-795 pour l'Ad16 ; Hearing et al., 1987, *J. Virol.* 61, 2555-2558 pour l'Ad5 ; Robinson et Tibbets, 1984, *Virology* 137, 276-286 pour l'Ad3 ; Shibata et al., 1989, *Virology* 172, 460-467 pour CAV2 ; WO95/16048 pour BAV3). A titre purement illustratif, on indique que la région d'encapsidation d'Ad5 s'étend au moins des nucléotides (nt) 240 à 350. Quant à celle de BAV3, elle est comprise au sein d'un fragment de 0,3 kb entre les positions environ 185 à environ 514. Néanmoins, les limites de la région d'encapsidation peuvent varier et des régions plus courtes ou plus longues conviennent également. L'homme du métier est capable d'isoler un fragment de l'extrémité 5' d'un génome adénoviral, de l'insérer dans un vecteur adéquat et de vérifier ses capacités d'encapsidation dans une lignée appropriée, par exemple en déterminant le titre viral ou l'expression d'un gène reporter.

Les séquences portant la région essentielle à l'encapsidation hétérologue peuvent être isolées d'un génome viral par des moyens conventionnels (digestion par enzyme de restriction, PCR ...) ou produites par synthèse chimique. Eventuellement, dans le cadre de la présente invention, elles peuvent comprendre des mutations (délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides) par rapport aux séquences natives. Il est également possible d'inclure d'autres séquences exogènes (sites de restriction...etc). Elles peuvent être insérée dans le vecteur adénoviral selon

l'invention *en sus* de la région autologue ou en remplacement de cette dernière. L'insertion peut avoir lieu en 5' ou en 3' de la région autologue, à sa place ou à un endroit différent (par exemple à l'extrémité 3' juste avant l'ITR 3').

Avantageusement, le vecteur adénoviral selon l'invention est originaire d'un  
5 adénovirus d'origine humaine et la région essentielle à l'encapsidation hétérologue  
d'un adénovirus d'origine animale. A cet égard, un vecteur convenant tout  
particulièrement à la présente invention dérive d'un adénovirus humain du sous  
groupe C et, notamment d'un adénovirus 2 (Ad2) ou 5 (Ad5). Quant à la région  
essentielle à l'encapsidation hétérologue, elle dérive de préférence d'un adénovirus  
10 animal sélectionné parmi ceux précédemment cités.

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, le vecteur adénoviral selon  
l'invention dérive d'un Ad5 et la région essentielle à l'encapsidation hétérologue d'un  
adénovirus bovin, notamment d'un BAV3.

On indique que les modes de réalisation précités sont préférés mais que  
15 d'autres combinaisons peuvent être mises en oeuvre dans le cadre de la présente  
invention. On peut par exemple envisager un vecteur adénoviral dérivant d'un Ad5 et  
comportant une région essentielle à l'encapsidation hétérologue issue d'un autre  
adénovirus humain de sérotype différent (Ad3, Ad7 ...etc). Alternativement, le  
squelette adénoviral peut être d'origine animale et la région essentielle à  
20 l'encapsidation issue d'un adénovirus humain.

Comme indiqué auparavant, le vecteur adénoviral selon l'invention est de  
préférence déficient au moins pour la fonction E1. Une telle déficience peut être  
obtenue par délétion totale ou partielle de la région correspondante. De nombreux  
vecteurs E1<sup>-</sup> sont décrits dans l'art antérieur et peuvent être utilisés dans le cadre de la  
25 présente invention. En outre, il peut comprendre des mutations /délétions  
supplémentaires affectant un ou plusieurs autres gènes viraux, notamment au sein des

régions E2, E4 et/ou L1-L5. Toutes les combinaisons peuvent être envisagées (E1' E2', E1' E4', E1' E2' E4' ...). De tels vecteurs sont notamment décrits dans la demande internationale WO94/28152. Pour illustrer ces modes de réalisation, on peut citer la mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., 1972, J. Virol. 10, 328-339). Une délétion partielle de la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 6 et 7 est également envisageable (Ketner et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17, 3037-3048). Une autre possibilité est la délétion totale de l'unité transcriptionnelle E4. Par ailleurs, le vecteur adénoviral selon l'invention peut être  
10 dépourvu de tout ou partie de la région non essentielle E3. Selon cette alternative, il peut être intéressant de conserver néanmoins les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990, Critical Review of Immunology 10, 53-71). Dans certaines applications (vecteur recombinant), la non-fonctionnalité de  
15 l'ensemble des gènes viraux est préférée.

Selon une première variante, le vecteur adénoviral selon l'invention peut être employé à titre de vecteur viral auxiliaire pour compléter tout ou partie des fonctions défectives d'un vecteur adénoviral recombinant. Selon un mode de réalisation avantageux, il est défectif au moins pour la fonction E1. Eventuellement, il  
20 peut être défectif pour des fonctions supplémentaires telles que E2. Un homme du métier est apte à définir les déficiences requises en fonction du vecteur recombinant que l'on cherche à compléter et de la lignée cellulaire choisie. On indique que la fonction E4 peut être assurée par l'ORF 6 et 7 uniquement. La présence de tout ou partie de la région E3 est facultative. Selon un mode de réalisation particulier, il  
25 comprend les séquences ITR 5' et 3' et les séquences codant pour les fonctions E2, E4 et/ou L1-L5 dérivant d'un adénovirus humain, notamment d'un Ad5 et une région d'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin, notamment d'un BAV3. Selon un autre mode de réalisation, le vecteur viral auxiliaire comprend les séquences

codant pour les fonctions E2, E4 et/ou L1-L5 dérivant d'un adénovirus humain, notamment d'un Ad5 et des séquences ITR 5', ITR 3' et région d'encapsidation hétérologues, dérivant d'un adénovirus bovin, notamment d'un BAV3.

On obtient un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'invention par insertion dans  
5 un génome adénoviral tel que défini ci-avant d'au moins une région essentielle à l'encapsidation hétérologue. Une manière préférée de procéder est de remplacer la région essentielle à l'encapsidation autologue par l'hétérologue. L'homme du métier est apte à réaliser une telle construction en appliquant les techniques classiques de biologie moléculaire.

10 Selon une seconde variante, le vecteur adénoviral selon l'invention est un vecteur adénoviral recombinant et comprend au moins un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule ou un organisme hôte.

Le gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut être issu d'un  
15 organisme eucaryote, d'un procaryote d'un parasite ou d'un virus autre qu'un adénovirus. Il peut être isolé par toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art, par exemple par clonage, PCR ou synthèse chimique. Il peut être de type génomique (comportant tout ou partie de l'ensemble des introns), de type ADN complémentaire (ADNc, dépourvu d'intron) ou de type mixte (minigène). Par ailleurs,  
20 il peut coder pour un ARN antisens et/ou un ARN messenger (ARNm) qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt celui-ci pouvant être (i) intracellulaire, (ii) incorporé dans la membrane de la cellule hôte ou (iii) sécrété. Il peut s'agir d'un polypeptide tel que trouvé dans la nature (natif), d'une portion de celui-ci (tronqué), d'un mutant présentant notamment des propriétés biologiques améliorées ou modifiées ou encore  
25 d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser un

gène d'intérêt codant pour une cytokine (interféron  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ , interleukine (IL), notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-12, un facteur nécrosant des tumeurs (TNF), un facteur stimulateur de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), un récepteur cellulaire (notamment reconnu par le virus HIV), un ligand de récepteur, 5 un facteur de coagulation, un facteur de croissance (FGF pour Fibroblast Growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor), une enzyme (uréase, rénine, thrombine, métalloprotéinase, nitric oxide synthétase NOS, SOD, catalase...), un inhibiteur d'enzyme ( $\alpha$ 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteur de protéase virale, PAI-1 pour plasminogen activator inhibitor), un antigène du complexe majeur 10 d'histocompatibilité de classe I ou II ou un polypeptide agissant sur l'expression des gènes correspondants, un polypeptide capable d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement, un polypeptide agissant positivement ou négativement sur l'apoptose (Bax, Bcl2, BclX...), un agent cytotatique (p21, p 16, Rb), une apolipoprotéine (ApoAI, ApoAIV, ApoE...), un 15 inhibiteur d'angiogénèse (angiostatine, endostatine...), un marqueur ( $\beta$ -galactosidase, luciférase...) ou tout autre gène d'intérêt ayant un effet thérapeutique pour l'affection ciblée. Plus précisément, dans le but de traiter un dysfonctionnement héréditaire, on utilisera une copie fonctionnelle du gène défectueux, par exemple un gène codant pour le facteur VIII ou IX dans le cadre de l'hémophilie A ou B, la dystrophine dans 20 le cadre des myopathies de Duchenne et Becker, l'insuline dans le cadre du diabète, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) dans le cadre de la mucoviscidose. S'agissant d'inhiber l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers, on mettra de préférence en oeuvre un gène d'intérêt codant pour un ARN anti-sens, un ribozyme, un produit cytotoxique (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique, produit des 25 gènes de levure *FCYI* et *FURI* codant pour l'uracyle phosphoribosyl transférase et la cytosine désaminase.....), un anticorps, un inhibiteur de la division cellulaire ou des signaux de transduction, un produit d'expression d'un gène suppresseur de tumeur

(p53, Rb, p73....), un polypeptide stimulateur du système immunitaire, un antigène associé à une tumeur (MUC-1, BRCA-1, antigènes précoces ou tardifs (E6, E7, L1, L2...) d'un virus à papillome HPV....), éventuellement en combinaison avec un gène de cytokine. Enfin, dans le cadre d'une thérapie anti-HIV, on peut avoir recours à un

5 gène codant pour un polypeptide immunoprotecteur, un épitope antigénique, un anticorps (2F5; Buchacher et al., 1992, *Vaccines* 92, 191-195), le domaine extracellulaire du récepteur CD4 (sCD4; Traunecker et al., 1988, *Nature* 331, 84-86) une immunoadhésine (par exemple un hybride CD4-immunoglobuline IgG; Capon et al., 1989, *Nature* 337, 525-531; Byrn et al., 1990, *Nature* 344, 667-670), une

10 immunotoxine (par exemple fusion de l'anticorps 2F5 ou de l'immunoadhésine CD4-2F5 à l'angiogénine; Kurachi et al., 1985, *Biochemistry* 24, 5494-5499), un variant trans-dominant (EP 0614980, WO95/16780), un produit cytotoxique tel que l'un de ceux mentionné ci-dessus ou encore un IFN $\alpha$  ou  $\beta$ .

Par ailleurs, un des gènes d'intérêt peut également être un gène de sélection

15 permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées ou transduites. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase). D'une manière générale,

20 les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

La locution "éléments nécessaires à l'expression" désigne les éléments génétiques permettant la transcription d'un gène d'intérêt en ARN et la traduction d'un ARNm en polypeptide. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même

25 virale et peut être constitutif ou régulable. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription,



rendre un promoteur constitutif régulable ou *vice versa*, introduire un site de restriction.... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothioneine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848),  $\alpha$ -1 antitrypsine, CFTR, surfactant, immunoglobuline,  $\beta$ -actine (Tabin et al., 1982, Mol. Cell Biol. 2, 426-436), SR $\alpha$  (Takebe et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 466-472), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur TK-HSV-1, le promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus) et les promoteurs adénoviraux E1A et MLP. Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748), tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et  $\alpha$ -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). Le promoteur précoce du Cytomégalovirus (CMV) est tout particulièrement préféré.

Les éléments nécessaires à l'expression peuvent, en outre, inclure des éléments additionnels améliorant l'expression du gène d'intérêt ou son maintien dans la cellule hôte. On peut citer notamment les séquences introniques, séquences signal de sécrétion, séquences de localisation nucléaire, sites internes de réinitiation de la traduction de type IRES, séquences poly A de terminaison de la transcription, leaders tripartites et origines de réplication. Ces éléments sont connus de l'homme de l'art.

Lorsque le vecteur adénoviral recombinant selon l'invention comporte plusieurs gènes d'intérêt, ceux-ci peuvent être placés sous le contrôle des mêmes éléments génétiques (cassette polycistronique utilisant un site interne d'initiation de la

traduction de type IRES pour réinitier la traduction du second cistron) ou d'éléments indépendants.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux consiste en un vecteur adénoviral recombinant comprenant une seconde région essentielle à l'encapsidation autologue par rapport au génome adénoviral dont il dérive. En d'autres termes, il porte deux régions d'encapsidation l'une autologue et l'autre hétérologue. Leur position dans le vecteur adénoviral peut être quelconque. Elles peuvent être notamment placées à l'une des extrémités ou séparées à chacune des extrémités dudit vecteur. Avantageusement, la région hétérologue est placée en 3' de la région autologue.

Dans le cadre de la présente invention, un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention est déficient pour la fonction E1 et l'une au moins des fonctions E2, E4 et/ou L1-L5. Un exemple préféré est fourni par un vecteur déficient pour l'ensemble des fonctions adénovirales (vecteur minimum) qui comprend outre le(s) gène(s) d'intérêt au moins les ITRs 5' et 3' et une région essentielle à l'encapsidation autologue dérivant d'un adénovirus humain, notamment d'un Ad5 et une région essentielle à l'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin, notamment d'un BAV3.

Il est à la portée de l'homme du métier de générer un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention par les techniques de biologie moléculaire. Il saura bien évidemment adapter la technologie en fonction des données spécifiques (type de vecteur, gène d'intérêt...).

La présente invention concerne également l'utilisation d'un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'invention pour compléter tout ou partie des fonctions défectives d'un vecteur adénoviral recombinant déficient pour la réplication, notamment d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention, lesdits vecteurs auxiliaire et

recombinant dérivant tous deux d'un même adénovirus et, en particulier d'un Ad5 et lesdites régions essentielles à l'encapsidation hétérologues portées par le vecteur auxiliaire et, éventuellement, le vecteur recombinant dérivant du même adénovirus différent du précédent et, en particulier d'un BAV3.

5 La présente invention concerne également une composition comprenant :

(a) un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'invention,

(b) un vecteur adénoviral recombinant défectif pour la réplication, notamment d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention, et

(c) de manière optionnelle, un génome adénoviral dérivant d'un  
10 adénovirus animal de la même origine que les régions essentielles à l'encapsidation hétérologues portées par les vecteurs auxiliaire et recombinant a) et éventuellement b).

La présente invention concerne également un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal, notamment d'un adénovirus bovin et, en particulier, d'un  
15 BAV3 caractérisé en ce qu'il présente une capacité d'encapsidation atténuée par rapport à l'adénovirus dont il dérive. L'atténuation a pour but de réduire la propagation du génome adénoviral au profit d'un génome portant une région native (vecteur adénoviral auxiliaire et recombinant selon l'invention). Elle peut être obtenue par délétion partielle de la région d'encapsidation ou par mutation d'un ou plusieurs  
20 motifs contrôlant le processus d'encapsidation. Un exemple d'atténuation est fourni dans la demande internationale WO94/28152 et dans Imler et al. (1995, Human Gene Therapy 6, 711-721). L'homme de l'art connaît les techniques qui permettent de vérifier l'atténuation, par exemple en déterminant le titre viral (Graham et Prevec, 1991, supra) ou l'expression d'un gène reporter par rapport à un virus équivalent  
25 portant une région essentielle à l'encapsidation native. Une région essentielle à l'encapsidation atténuée présente une efficacité d'encapsidation réduite d'un facteur 2

à 1000, avantageusement 3 à 100 et, de manière préférée, 5 à 50.

Le génome adénoviral animal selon l'invention peut être compétent pour la replication ou comprendre des modifications touchant un ou plusieurs gènes viraux, telles que celles citées précédemment. En particulier, la délétion totale ou partielle de  
5 la région E1 dudit génome peut être avantageuse dans le cadre de la présente invention. On indique que le génome et/ou les vecteurs peuvent être sous forme d'ADN ou de virus.

La présente invention concerne également un procédé pour préparer une préparation virale comprenant un vecteur adénoviral recombinant défectif pour la  
10 réplication, notamment d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention, selon lequel :

(a) on introduit dans une première lignée cellulaire

(i) un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'invention,

(ii) un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal, et

15 (iii) ledit vecteur adénoviral recombinant

ledit génome adénoviral (ii) étant de la même origine que les régions essentielles à l'encapsidation hétérologues portées par les vecteurs (i) et éventuellement (iii) et ledit génome adénoviral (ii) et les vecteurs (i) et (iii) étant capables de se répliquer dans ladite première lignée cellulaire,

20 (b) on cultive ladite première lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre la production de particules virales comportant les vecteurs (i) et (iii) et le génome adénoviral (ii),

(c) on récupère lesdites particules virales obtenues à l'étape b) dans la culture cellulaire,

(d) on infecte une seconde lignée cellulaire avec lesdites particules virales récupérées à l'étape c), ledit vecteur auxiliaire (i) et ledit génome adénoviral (ii) ayant une capacité d'encapsidation et/ou de réplication nulle ou réduite dans ladite seconde lignée cellulaire,

5 (e) on cultive ladite seconde lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre l'encapsidation dudit vecteur adénoviral recombinant (iii) et produire ladite préparation virale, et

(f) on récupère ladite préparation virale obtenue à l'étape e) dans la culture cellulaire.

10 Aux fins de la présente invention, les vecteurs et génomes adénoviraux peuvent être introduits par tous les moyens de l'art dans la première lignée cellulaire, notamment par transfection et/ou infection. Il est possible de transfecter les vecteurs dans la lignée qui est infectée par des particules de génome adénoviral animal (préalablement, postérieurement ou de manière concomitante à la transfection). Les  
15 virus contenant les différents éléments (i) (ii) ou (iii) peuvent être constitués selon les techniques de l'art. Par ailleurs, ledit vecteur adénoviral recombinant défectif pour la réplication peut consister en un vecteur tel que décrit dans WO 94/28152, WO 94/08026, WO 93/19191 ou WO 94/12649.

Par ailleurs, le génome (ii) peut être sauvage, selon l'invention (atténué) et/ou  
20 comprendre une ou plusieurs modifications affectant la fonctionnalité d'un ou de plusieurs gènes viraux.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux, la première cellule comprend

(i) un vecteur adénoviral auxiliaire défectif au moins pour la fonction E1, dérivant d'un adénovirus humain (notamment d'un Ad5) et portant une région  
25 essentielle à l'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin (notamment d'un BAV3),

- 19 -

(ii) un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus bovin (notamment d'un BAV3), éventuellement selon l'invention, et

(iii) vecteur adénoviral recombinant défectif pour la fonction E1 et au moins l'une des fonctions E2, E4 et/ou L1-L5 et portant une seconde région d'encapsidation autologue telle que définie ci-avant, dérivant d'un adénovirus humain (notamment d'un Ad5) et portant une région essentielle à l'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin (notamment d'un BAV3),

ladite première lignée cellulaire étant d'origine bovine.

Selon un mode de réalisation tout à fait avantageux, le vecteur adénoviral auxiliaire défectif dont il est question en (i) des procédés décrits ci-dessus comprend une région essentielle à l'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin (notamment d'un BAV3) qui comporte les ITR 5' et 3', et la région d'encapsidation.

De manière alternative on peut avoir recours à un génome adénoviral (ii) défectif pour la fonction E1. S'agissant de la variante préférée, un génome BAV3 défectif pour la fonction E1 est décrit dans la demande internationale WO95/16048. Dans ce cas, on aura recours à une première lignée cellulaire capable de compléter la fonction E1 dudit génome adénoviral d'origine animale. On emploiera de préférence une lignée de la même origine animale que ledit génome adénoviral (ii). Il peut s'agir d'une lignée établie ou d'une lignée primaire.

Le terme cellule de complémentation est classique dans le domaine de l'art. Dans le cadre de la présente invention, il se réfère à une cellule eucaryote capable de fournir *en trans* au moins une partie des fonctions défectueuses d'un vecteur ou génome adénoviral selon l'invention. D'une manière générale, une cellule de complémentation d'une fonction adénovirale peut être obtenue par transfection des gènes viraux correspondant dans une lignée cellulaire appropriée. Tous les moyens standards pour introduire un ADN dans une cellule peuvent être employés

(transfection au phosphate de calcium, electroporation, microinjection, lipofection, fusion de protoplastes....). Par ailleurs, les gènes viraux sont portés par des vecteurs conventionnels (vecteurs synthétiques, viraux, plasmides...) et placés sous le contrôle d'éléments permettant leur expression constitutive ou régulée dans ladite cellule de complémentation. Les lignées de complémentation adaptées aux vecteurs adénoviraux sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple la demande internationale WO94/28152, WO97/04119 et Graham et al., J. Gen. Virol., 1977, 36: 59-72).

Une lignée bovine convenant particulièrement dérive d'une lignée MDBK (ATCC CCL-22 ou CRL-6071) ou de cellules primaires, notamment de rétine ou de rein foetal et comprend les séquences codant pour la région E1 d'un adénovirus bovin et, en particulier d'un BAV3 placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans ladite lignée.

Selon un mode de réalisation préféré, la seconde lignée cellulaire est une cellule de complémentation de la fonction E1 d'un adénovirus humain, notamment d'un Ad5. On aura de préférence recours à la lignée 293. Mais d'autres lignées telles que celles décrites dans la demande WO94/28152 peuvent également être employées.

Les particules virales de l'étape c) et la préparation virale peuvent être récupérées du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent ensuite être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium....).

La présente invention concerne également la préparation virale obtenue selon le procédé selon l'invention. Selon un mode de réalisation avantageux, elle comporte au moins 30% de particules virales infectieuses contenant le vecteur adénoviral

recombinant selon l'invention. Avantageusement, elle comporte au moins 50%, de préférence, au moins 70% et, de manière tout à fait préférée, au moins 80% desdites particules.

La présente invention concerne également une cellule hôte comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention ou infectée par une préparation virale selon l'invention. Une cellule de mammifère et notamment humaine convient tout particulièrement. Elle peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée dans le génome ou non (épisode). Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste...), cardiaque, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

La présente invention concerne également une cellule comprenant :

- (i) un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'invention,
- (ii) un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal, et
- (iii) un vecteur adénoviral recombinant déficient pour la réplication, notamment d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention.

Ladite cellule est de préférence une cellule de complémentation d'une fonction adénovirale et, en particulier, de la fonction E1 d'un adénovirus animal ou humain. Elle a les caractéristiques définies ci-avant.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur adénoviral, une préparation virale ou une cellule hôte selon l'invention en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La composition selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement préventif ou curatif de maladies par thérapie génique et s'adresse aussi bien aux maladies génétiques



(hémophilie, diabète, mucoviscidose, myopathie de Duchenne ou de Becker, maladies auto immunes) qu'acquises (cancers, tumeurs, maladies cardiovasculaires, maladies d'origine infectieuse comme l'hépatite B ou C, le SIDA....).

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de  
5 manière conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire,  
10 intraveineuse, intraartérielle, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers  
15 paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. La préparation virale selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages), avantageusement  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{12}$  ufp. Pour ce qui est du vecteur adénoviral recombinant selon l'invention, des doses comprenant de  
20 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, 0,5 à 5 mg sont envisageables. La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Elle peut être présentée sous forme liquide ou sèche (lyophilisat ... etc).

Le vecteur ou la préparation virale selon l'invention peut être éventuellement  
25 associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité. Ces substances sont largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc.

32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de protéines nucléaires ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être  
5 utilisées seules ou en combinaison.

Enfin, la présente invention est relative à l'utilisation d'un vecteur adénoviral, d'une préparation virale ou d'une cellule hôte selon l'invention pour le transfert et l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte. Une utilisation préférée consiste en le traitement du corps humain ou animal par thérapie  
10 génique ou immunothérapie. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les  
15 transférer ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient. L'utilisation préférée est pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies par thérapie génique ou immunothérapie.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur adénoviral  
20 recombinant, d'une préparation virale ou d'une cellule hôte selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

#### EXEMPLES

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

25 Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989,

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de recombinaison homologue sont de préférence réalisées dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la  
5 réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 et de BAV3 telle que  
10 divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260 et AFO30154 respectivement.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. Dans les exemples qui suivent, on a recours aux lignées cellulaires 293  
15 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573) et MDBK (ATCC CRL-6071 ou CCL-22). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées.

EXEMPLE 1 : Absence de multiplication des virus BAV3 dans les lignées humaines

20 La lignée humaine MDBK et les lignées humaines A549 (ATCC CCL-185), HeLa (ATCC CCL-2) et 293 (ATCC CRL-1573) sont infectées par un virus sauvage BAV3 à différentes MOI (1, 2 et 10). Les cellules sont récoltées 3 jours après l'infection et les titres viraux déterminés sur les cellules permissives MDBK. Le facteur de multiplication est inférieur à 1 dans le cas de l'infection des cellules  
25 humaines alors qu'il est compris entre 50 et 100 pour la lignée bovine. Ces résultats indiquent l'incapacité du vecteur BAV3 à se propager dans les lignées humaines.

L'expression des gènes viraux de BAV3 est vérifiée par PCR réverse après infection du virus BAV3 dans des lignées humaines établies (A549, HeLa, 293, MRC5, RPMI) ou primaires (lignée primaire de muscle PHM). La lignée contrôle est constituée par la lignée MDBK. Les cellules sont recueillies et on isole les  
5 ARN polyA+ selon les techniques conventionnelles. La transcription réverse est réalisée avec une amorce antisens spécifique de la région E1 et suivie d'une amplification par PCR avec la même amorce et une amorce sens spécifique de E1. Les produits PCR sont soumis à une analyse par Southern blot et détectés par une sonde spécifique de E1 permettant de détecter une bande de 626 pb correspondant à  
10 l'ADN génomique et de 519 pb dérivé de l'ARNm polyA+. Dans les cellules MDBK, on observe une expression du gène viral E1 qui est maximale 16 heures après l'infection. E1 est également exprimée dans la lignée 293. Par contre aucune expression d'ARNm E1 ne peut être détectée dans toutes les autres lignées humaines testées.

15 Ces résultats montrent que les cellules humaines sont infectées par le virus BAV3 mais que celui-ci ne peut pas s'y répliquer.

#### EXEMPLE 2 : Construction de vecteurs adénoviraux chimères Ad5/BAV3

On construit tout d'abord un vecteur comprenant une cassette d'expression du gène bactérien LacZ codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Pour ce faire, le fragment  
20 XhoI-SalI de pTG8595 (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2033) portant les séquences codantes LacZ est cloné dans le site XhoI du plasmide pCI (Promega). Ce dernier est un vecteur d'expression eucaryote comprenant le promoteur CMV, des séquences d'épissage, des sites multiples de clonage et la séquence polyA de SV40. La cassette d'expression du gène LacZ flanqué des éléments de régulation précités est  
25 isolée sous forme d'un fragment BglII-BamHI et introduit dans le site BglII du vecteur de transfert pTG8343, pour donner pTG6452. A titre indicatif, le vecteur de transfert comporte l'extrémité 5' de l'Ad5 délété de la majorité des séquences E1 (nt 1

à 458 et 3329 à 5788) insérée dans un plasmide ppolyII (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). Le génome adénoviral est reconstitué par recombinaison homologue entre le fragment PacI-NsiI obtenu de pTG6452 et le vecteur pTG3652 portant le génome Ad5 délété de la région E3 clivé par l'enzyme ClaI. Le vecteur ainsi obtenu, nommé  
5 pTG6481, contient les séquences Ad5 dépourvues des régions E1 (nt 459 à 3328) et E3 (nt 28249 à 30758) et la cassette pCMV-LacZ-pA SV40 clonée en lieu et place de la région E1. La région d'encapsidation est d'origine Ad5.

L'étape suivante est d'insérer la région d'encapsidation de BAV3 dans le vecteur précédent. Deux sites d'insertion ont été testés : le premier en amont de la  
10 région d'encapsidation native, au niveau du site AflIII en position 151 du génome Ad5 et l'autre en aval de celle-ci au niveau du site SalI (en position 451 de l'Ad5). La première construction pTG6466 est générée par digestion AflIII de pTG6452, traitement à la Klenow et introduction du fragment HaeII-PvuII de 844 pb recouvrant les séquences en positions 141 à 984 du génome BAV3, ce fragment ayant été soumis  
15 au préalable à l'action de la Klenow. Le vecteur pTG6467 est généré selon le même protocole mis à part que pTG6452 est linéarisé par SalI. Ainsi les vecteurs pTG6466 et pTG6467 contiennent deux régions d'encapsidation, l'une d'origine Ad5 et l'autre d'origine BAV3 (environ 0,8 kb).

On a également mis en oeuvre une région d'encapsidation BAV3 réduite issue  
20 de la précédente par digestion ThaI ou Bstul (positions 185 à 514 du génome BAV3). Comme précédemment, la région BAV3 d'environ 0,3 kb est insérée dans les vecteurs recombinants Ad5 soit au niveau du site AflIII (en 5' de la région psi autologue) en au niveau du site SalI (en 3' de la région psi autologue). Dans ce dernier cas, on génère le vecteur de transfert pTG6458 et le génome adénoviral est  
25 reconstitué par recombinaison homologue comme précédemment pour donner pTG6482.

Puis on génère une construction dans laquelle la région d'encapsidation

d'Ad5 est échangée contre son homologue BAV3. Le vecteur pTG6452 est digéré par AflIII (nt151) et SalI (nt 451) puis traité à la polymérase Klenow. Le fragment de 300 pb portant la région d'encapsidation Ad5 est remplacé par le fragment HaeII-PvuII (844 pb) isolé de BAV3 et rendu franc par l'action de la Klenow. On obtient  
5 pTG6468 qui porte la seule région d'encapsidation de BAV3 dans un contexte Ad5. Une construction identique met en oeuvre la région d'encapsidation BAV3 de 0,3 kb.

Les régions modifiées sont réintroduites dans le génome adénoviral par recombinaison homologue comme indiqué précédemment.

De manière identique, un vecteur adénoviral auxiliaire dérivé du génome de  
10 l'Ad 5 comportant la région d'encapsidation et les ITR 5' et 3' de BAV3 a été construit. Pour cela, le vecteur pTG13373 qui est dérivé du génome d'Ad5 délété des régions E1 et E3 est construit, comportant l'ITR 5' et la région d'encapsidation de 0,3 kb du génome de BAV3.

Le vecteur pTG 13373 est obtenu par le remplacement de l'ITR 5' et de la  
15 région d'encapsidation d'Ad5 présents dans pTG 8343, par l'ITR 5' et la région d'encapsidation de BAV 3 présents dans pTG 5431 ; à titre indicatif, pTG 5431 est constitué de l'extrémité 5' (nucléotides 1 à 8217) du génome de BAV 3. Pour ce faire, pTG 8343 est digéré par Bgl II, soumis à l'action de la Klenow, puis digéré par Pac I, et pTG 5431 est digéré par Acc I, traité à la Klenow, et digéré par Pac I. Les  
20 fragments ainsi obtenus sont liés pour donner pTG 13372. Finalement, pTG 13373 est obtenu par recombinaison homologue entre les fragments obtenus de pTG 13372 digéré par Bgl I et de pTG 6401 digéré par Pac I.

Le vecteur pTG 14310 dérivé du génome de l'Ad5 délété des régions E1 et E3 et comprenant les ITR 5' et 3' ainsi que la région d'encapsidation de BAV 3 est  
25 ensuite obtenu de la manière suivante.

On procède au remplacement de l'ITR 3' d'Ad5 dans le vecteur pTG 13384

(constitué par l'extrémité 3' (nucléotides 32800 à 35935) du génome de l'Ad 5 ; une cassette de clonage étant insérée entre les nucléotides 35826 et 35827) par l'ITR 3' de BAV 3. Pour ce faire, pTG 13384 est digéré par Xba I, soumis à l'action de la Klenow, puis digéré par Pac I. D'autre part, pTG 5451 est digéré par Apo I, traité à  
5 la Klenow, et digéré par Pac I. A titre indicatif, le vecteur pTG 5451 comprend les extrémités 5' (nucléotides 1 à 1651 délétés du fragment 829-1077) et 3' de BAV 3 (nucléotides 33232 à 34446) séparées par un site de restriction unique Hind III. Les fragments ainsi obtenus sont liés pour donner pTG 14261.

Par ailleurs, la recircularisation de pTG 14261 après digestion par XbaI et  
10 Bam HI et action de la Klenow permet l'élimination du site de clivage Hind III en amont de l'ITR bovin de pTG 14261. On obtient ainsi le vecteur pTG 14262.

Parallèlement, on procède à la recircularisation de pTG 13373 digéré par Hind III pour obtenir pTG 14263 qui contient l'ITR 5' et la séquence d'encapsulation de 0,3 kb de BAV 3 ainsi que l'ITR 3' de l'Ad5.

15 On procède ensuite au remplacement de l'ITR 3' de l'Ad5 dans le vecteur pTG 14263 par l'ITR 3' de BAV 3 de pTG 14262. Pour ce faire, pTG 14263 et pTG 14262 sont digérés par Hind III et Pac I. Les fragments ainsi obtenus sont liés pour donner pTG 14266.

Enfin, le génome adénoviral est reconstitué par recombinaison homologue  
20 entre pTG 14266 linéarisé par Hind III et pTG 13373 digéré par Pac I. Le vecteur obtenu nommé pTG 14310 dérive du génome d'Ad 5 délété des régions E1 et E3 et contient les ITR 5' et 3' ainsi que la région d'encapsulation de BAV 3.

Un génome adénoviral similaire à celui de pTG 14310 mais comportant une région d'encapsulation de BAV3 de 0,8 kb a également été obtenu. On a pour cela  
25 procédé au remplacement de l'ITR 5' et de la région d'encapsulation d'Ad5 présents dans pTG 8343 par l'ITR 5' et la région d'encapsulation de 0,8 kb de BAV 3

présents dans pTG 5431. Pour ce faire, pTG 8343 est digéré par Bgl II, soumis à l'action de la Klenow, puis digéré par Pac I. D'autre part, pTG 5431 est digéré par Pvu II et Pac I. Les fragments ainsi obtenus sont liés pour donner pTG 14313.

On procède ensuite au remplacement de l'ITR 5' et de la région d'encapsulation de 0,3 kb de BAV 3 présents dans pTG 14266 par l'ITR 5' et la région d'encapsulation de 0,8 kb de BAV 3 présents dans pTG 14313. Pour ce faire, on procède à une recombinaison homologe entre les fragments Ssp I / Mfe I obtenu de pTG 14266 et Sca I / Nsi I obtenu de pTG 14313. Le vecteur ainsi obtenu est nommé pTG 14315.

10 Finalement le génome adénoviral est reconstitué par recombinaison homologe entre les fragments Hind III obtenu de pTG 14315 et Pac I obtenu de pTG 6401. Le vecteur ainsi obtenu, nommé pTG 14316, dérive du génome de l'Ad 5 et comporte les ITR 5' et 3' ainsi que la région d'encapsulation de 0,8 kb de BAV 3.

Un exemple supplémentaire de vecteur selon l'invention consiste en un vecteur dérivé du génome de l'Ad5 délété des régions E1 et E3 et contenant les ITR 5' et 3' ainsi que la région d'encapsulation de 0,3 kb de BAV 3, dans lequel la région d'encapsulation a été insérée juste en amont de l'ITR 3'.

Pour construire un tel vecteur, on procède tout d'abord à la délétion de la région d'encapsulation de BAV 3 dans pTG 13372 et dans pTG 14266. Pour cela, pTG 13372 est digéré par Afl III, soumis à l'action de la Klenow, puis digéré par Pac I et pTG 14262 est digéré par Pvu II et Pac I. Les fragments ainsi obtenus sont liés pour donner pTG 14311.

La délétion de la région d'encapsulation bovine de pTG 14266 est obtenue par recombinaison homologe entre le fragment Xmn I / Dra III obtenu de pTG 14266 et le fragment Pvu I / Sph I obtenu de pTG 14311. On obtient alors le vecteur pTG 14328.



On procède ensuite au remplacement de l'ITR 3' d'Ad5 dans pTG 13384 par l'ITR 3' et la séquence d'encapsidation de 0,3 kb de BAV 3 présents sur pTG 5431. Pour cela, pTG 13384 est digéré par Bam HI, soumis à l'action de la Klenow, puis digéré par Pac I. D'autre part, pTG 5431 est digéré par Afl III, traité à la Klenow, et  
5 digéré par Pac I. Les fragments ainsi obtenus sont liés pour donner pTG 14271.

L'introduction de la séquence d'encapsidation BAV 3 juste en amont de l'ITR 3' est réalisée par ligature des fragments Eco RI / Hind III obtenus de pTG14328 et de pTG 14271. Le vecteur ainsi obtenu est nommé pTG 14330.

Le génome adénoviral est ensuite reconstitué par recombinaison homologue  
10 entre les fragments Hind III de pTG 14330 et Pac I de pTG 6401. On obtient alors le vecteur pTG prod 11 qui dérive du génome de l'Ad5 délété des régions E1 et E3 et contient les ITR 5' et 3' ainsi que la région d'encapsidation de 0,3 kb de BAV 3 insérée juste en amont de l'ITR 3'.

#### EXEMPLE 3 : Production de particules virales.

15 Les génomes viraux pTG6468 (auxiliaire) et pTG6467 ou pTG6466 (recombinant) sont transfectés dans les cellules bovines de la lignée MBDK. Puis, les cellules transfectées sont infectées par un génome BAV3 sauvage ou atténué. Puisque l'Ad5 peut se propager dans les cellules bovines en présence d'un virus BAV3 et que les trois éléments viraux contiennent une région d'encapsidation de BAV3, ils peuvent  
20 être empaquetés dans les capsides virales et générer des particules virales infectieuses. Le mélange est récupéré et on procède éventuellement à une étape d'amplification par cycles d'infection successifs de cellules MBDK afin de constituer un stock viral des trois types de virus. Lors de cette première étape sur cellules bovines, le génome BAV3 produit les facteurs agissant *en trans* pour l'encapsidation du vecteur auxiliaire  
25 lequel fournit les fonctions virales nécessaires à la propagation du vecteur recombinant. L'encapsidation de ce dernier peut être médiée par des facteurs

adénoviraux d'origine BAV3 et Ad5 dans la mesure où il possède les régions d'encapsidation des deux origines et les capsides peuvent contenir des protéines structurales BAV3 ou Ad5.

Le mélange viral généré dans la lignée bovine est utilisé pour infecter des  
5 cellules humaines 293. Dans ces cellules, le virus BAV3 ne peut se propager même en  
présence d'Ad5. Cependant le vecteur auxiliaire d'origine Ad5 peut répliquer son  
génom viral et exprimer l'ensemble des gènes viraux précoces et tardifs qu'il porte.  
Par contre, il ne peut être encapsidé du fait qu'il est muni d'une seule région  
d'encapsidation BAV3. Au contraire, le vecteur recombinant peut l'être par  
10 l'intermédiaire de la région d'encapsidation d'origine Ad5 et des facteurs  
d'encapsidation fournis par le vecteur auxiliaire. Les particules virales générées sont  
récupérées et peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques.

REVENDICATIONS

1. Vecteur adénoviral dérivant d'un génome adénoviral caractérisé en ce qu'il  
5 comprend une région essentielle à l'encapsidation hétérologue par rapport audit  
génome adénoviral.
2. Vecteur adénoviral selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il dérive d'un  
adénovirus d'origine humaine et que ladite région essentielle à l'encapsidation  
hétérologue dérive d'un adénovirus d'origine animale.
- 10 3. Vecteur adénoviral selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il dérive d'un  
adénovirus humain du sous groupe C et notamment d'un adénovirus 2 (Ad2) ou 5  
(Ad5).
4. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite  
région essentielle à l'encapsidation hétérologue dérive d'un adénovirus animal  
15 sélectionné parmi les adénovirus canins, aviaires, bovins, murins, ovins, porcins et  
simiens.
5. Vecteur adénoviral selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il dérive d'un  
Ad5 et que ladite région essentielle à l'encapsidation hétérologue dérive d'un  
adénovirus bovin.
- 20 6. Vecteur adénoviral selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit adénovirus  
bovin est BAV3.
7. Vecteur adénoviral selon l'un des revendication 1 à 6, caractérisé en ce que ladite  
région essentielle à l'encapsidation comprend la région d'encapsidation.
8. Vecteur adénoviral selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite région

essentielle à l'encapsidation comprend en outre les ITR 5' et 3'.

9. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est défectif au moins pour la fonction E1.

10. Vecteur adénoviral selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est en outre  
5 défectif pour l'une au moins des fonctions sélectionnées parmi les fonctions E2, E3, E4 et L1-L5.

11. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur auxiliaire permettant de compléter tout ou partie des fonctions défectives d'un vecteur adénoviral recombinant.

10 12. Vecteur adénoviral auxiliaire selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend les séquences ITR 5' et 3' et les séquences codant pour les fonctions E2, E4 et/ou L1-L5 dérivant d'un adénovirus humain, et une région d'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin.

13. Vecteur adénoviral auxiliaire selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il  
15 comprend les séquences codant pour les fonctions E2, E4 et/ou L1-L5 dérivant d'un adénovirus humain, et les séquences ITR 5' et 3' et la région d'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin.

14. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est recombinant et comprend au moins un gène d'intérêt placé sous le contrôle des  
20 éléments nécessaires à son expression dans une cellule ou un organisme hôte.

15. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt est sélectionné parmi les gènes codant pour un ARN antisens, une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, un facteur de croissance, une enzyme, un

inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet anti-tumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment le VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine, un inhibiteur d'angiogénèse et un marqueur.

- 5 16. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une seconde région d'encapsidation autologue par rapport au génome adénoviral dont il dérive.
17. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il est déficient pour l'ensemble des fonctions adénovirales et comprend outre ledit gène  
10 d'intérêt, au moins les ITRs 5' et 3' et ladite région d'encapsidation autologue dérivant d'un adénovirus humain, et ladite région d'encapsidation hétérologue dérivant d'un adénovirus bovin.
18. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que la région d'encapsidation hétérologue est insérée en 3' de la région  
15 d'encapsidation autologue.
19. Utilisation d'un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'une des revendications 11 à 13 pour compléter tout ou partie des fonctions déficientes d'un vecteur adénoviral recombinant déficient pour la réplication, lesdits vecteurs auxiliaire et recombinant dérivant d'un même premier adénovirus et, en particulier d'un Ad5 et lesdites régions  
20 essentielles à l'encapsidation hétérologues portées par le vecteur auxiliaire dérivant d'un second adénovirus différent du premier et, en particulier d'un BAV3.
20. Utilisation selon la revendication 19 caractérisée en ce que le vecteur adénoviral recombinant déficient pour la réplication est un vecteur selon l'une des revendications 1 à 10 et 14 à 18, lesdits vecteurs auxiliaire et recombinant dérivant d'un même  
25 premier adénovirus et lesdites régions essentielles à l'encapsidation hétérologues

portées par le vecteur auxiliaire et ledit vecteur recombinant dérivant d'un second adénovirus différent du premier .

21 . Composition comprenant :

- (a) un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'une des revendications 11 à 13,
- 5 (b) un vecteur adénoviral recombinant défectif pour la réplication , et
- (c) de manière optionnelle un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal de la même origine que les régions essentielles à l'encapsidation hétérologues portées par le vecteur a).

22. Composition selon la revendication 21 caractérisée en ce que ledit vecteur  
10 recombinant adénoviral défectif pour la réplication (b) est un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 1 à 10 et 14 à 18 et en ce que l'on a en (c) de manière optionnelle, un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal de la même origine que les régions essentielles à l'encapsidation hétérologues portées par les vecteurs a) et b).

15 23. Génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal, notamment d'un adénovirus bovin et en particulier d'un BAV3, caractérisé en ce qu'il présente une capacité d'encapsidation atténuée par rapport à l'adénovirus dont il dérive.

24. Procédé pour préparer une préparation virale comprenant un vecteur adénoviral recombinant défectif pour la réplication, selon lequel :

- 20 (a) on introduit dans une première lignée cellulaire
  - (i) un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'une des revendications 11 à 13,
  - (ii) un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal, et

- (iii) ledit vecteur adénoviral recombinant,
- ledit génome adénoviral (ii) étant de la même origine que les régions essentielles à l'encapsulation hétérologues portées par le vecteur (i) et ledit génome adénoviral (ii) et les vecteurs (i) et (iii) étant capables de se répliquer dans ladite première
- 5 lignée cellulaire,
- (b) on cultive ladite première lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre la production de particules virales comportant les vecteurs (i) et (iii) et le génome adénoviral (ii),
- (c) on récupère lesdites particules virales obtenues à l'étape b) dans la culture
- 10 cellulaire,
- (d) on infecte une seconde lignée cellulaire avec lesdites particules virales récupérées à l'étape c), ledit vecteur auxiliaire (i) et ledit génome adénoviral (ii) ayant une capacité d'encapsulation et/ou de répllication nulle ou réduite dans ladite seconde lignée cellulaire;
- 15 (e) on cultive ladite seconde lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre l'encapsulation dudit vecteur adénoviral recombinant (iii) et produire ladite préparation virale, et
- (f) on récupère ladite préparation virale obtenue à l'étape e) dans la culture cellulaire.
- 20 25. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant défectif pour la répllication est un vecteur selon l'une des revendications 1 à 10 et 14 à 18 et en ce que ledit génome adénoviral (ii) est de la même origine que les régions essentielles à l'encapsulation hétérologues portées par les vecteurs (i) et (iii) et ledit génome adénoviral (ii), et les vecteurs (i) et (iii) sont capables de se

répliquer dans ladite première lignée cellulaire.

26. Procédé selon la revendication 25, selon lequel on introduit dans ladite première lignée cellulaire :

- 5 (i) un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'une des revendications 11-13 défectif au moins pour la fonction E1,
- (ii) un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus bovin, notamment d'un BAV3, éventuellement selon la revendication 23, et
- (iii) un vecteur adénoviral recombinant défectif pour la fonction E1 et au moins l'une des fonctions E2, E4 et/ou L1-L5, notamment un vecteur selon l'une des  
10 revendications 14 à 18,

ladite première lignée cellulaire étant d'origine bovine.

27. Procédé selon l'une des revendications 24 à 26, selon lequel ledit génome adénoviral (ii) est défectif pour la fonction E1 et ladite première lignée cellulaire est une cellule de complémententation de la fonction E1 dudit génome adénoviral (ii).

- 15 28. Procédé selon la revendication 27, selon lequel ladite première lignée cellulaire dérive d'une lignée MDBK ou de cellules primaires bovines de rétine ou de rein foetal et comprend les séquences codant pour la région E1 d'un adénovirus bovin et en particulier d'un BAV3 placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression.

- 20 29. Procédé selon l'une des revendications 24 à 28, selon lequel ladite seconde lignée cellulaire est une cellule de complémententation de la fonction E1 d'un adénovirus humain, notamment d'un Ad5.

30. Procédé selon la revendication 29, selon lequel ladite seconde lignée cellulaire est



la lignée 293.

31. Préparation virale obtenue selon le procédé selon l'une des revendications 24 à 30.

32. Préparation virale selon la revendication 31, comprenant au moins 30 % de  
5 particules virales infectieuses contenant un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 1 à 10 et 14 à 18.

33. Cellule hôte comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 18 ou infectée par une préparation virale selon la revendication 31 ou 32.

34. Cellule comprenant :

- 10 (i) un vecteur adénoviral auxiliaire selon l'une des revendications 11 à 13, et  
(ii) un génome adénoviral dérivant d'un adénovirus animal.

35. Cellule selon la revendication 34 renfermant en outre (iii) un vecteur adénoviral recombinant défectif, et notamment un vecteur selon l'une des revendications 1 à 10 et 14 à 18,

15 36. Composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 10 et 14 à 18, une préparation virale selon la revendication 31 ou 32 ou une cellule hôte selon la revendication 33.

20 37. Utilisation d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 10 et 14 à 18, d'une préparation virale selon la revendication 31 ou 32 ou d'une cellule hôte selon la revendication 33, pour le transfert et l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte.

38. Utilisation d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications revendications 1

à 10 et 14 à 18, d'une préparation virale selon la revendication 31 ou 32 ou d'une cellule hôte selon la revendication 33, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies par thérapie génique ou immunothérapie.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL/FR 99/01238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GHOSH-CHOUDHURY G. ET AL.: "HUMAN ADENOVIRUS CLONING VECTORS BASED ON INFECTIOUS BACTERIAL PLASMIDS" GENE, vol. 50, no. 1/03, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 161-171, XP002004335	1,7,9, 10,16, 18,32,33
Y	page 170, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1	11,14, 15,23, 36-38
Y	WO 97 45550 A (BAXTER INT ;ZHANG WEI WEI (US); ALEMANY RAMON (US); DAI YIFAN (US)) 4 December 1997 (1997-12-04) the whole document	11,14, 15,36-38
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  24 September 1999		Date of mailing of the international search report  01/10/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31-651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Mandl, B



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/1238

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claim 37, insofar as it involves 'in vivo' methods, concerns a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out of the basis on the effects attributed to the product/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PL/FR 99/01238

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9745550	A	04-12-1997	NONE	
FR 2707664	A	20-01-1995	AU 6905298 A	30-07-1998
			AU 7264694 A	13-02-1995
			BR 9405507 A	25-05-1999
			CA 2144040 A	26-01-1995
			CN 1113390 A	13-12-1995
			CZ 9500639 A	15-11-1995
			EP 0667912 A	23-08-1995
			FI 951138 A	13-04-1995
			WO 9502697 A	26-01-1995
			HU 72558 A	28-05-1996
			JP 8501703 T	27-02-1996
			NO 950939 A	10-03-1995
			NZ 269156 A	26-03-1996
			PL 308122 A	24-07-1995
			SK 31295 A	08-05-1996
			ZA 9405012 A	20-02-1995

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/01238

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GHOSH-CHOUDHURY G. ET AL.: "HUMAN ADENOVIRUS CLONING VECTORS BASED ON INFECTIOUS BACTERIAL PLASMIDS" GENE, vol. 50, no. 1/03, 1 janvier 1986 (1986-01-01), pages 161-171, XP002004335	1, 7, 9, 10, 16, 18, 32, 33
Y	page 170, colonne de gauche, dernier alinéa -colonne de droite, alinéa 1	11, 14, 15, 23, 36-38
Y	WO 97 45550 A (BAXTER INT ;ZHANG WEI WEI (US); ALEMANY RAMON (US); DAI YIFAN (US)) 4 décembre 1997 (1997-12-04) le document en entier	11, 14, 15, 36-38
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mandl, B

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PL./FR 99/01238

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	REDDY ET AL.: "Nucleotide sequence, genome organization and transcription map of bovine adenovirus type 3" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 2, février 1998 (1998-02), pages 1394-1402, XP002087289	23
A	page 1396, colonne de gauche, ligne 11 - ligne 14	6-12, 17-19, 26-38
A	FR 2 707 664 A (CENTRE NAT RECH SCIENT; ROUSSY INST GUSTAVE) 20 janvier 1995 (1995-01-20) page 4, ligne 4 -page 5, ligne 17	1-38
A	MITTAL ET AL.: "Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 76, 1995, pages 93-102, XP002087288 le document en entier	1-38



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande internationale n°

PCT/FR 99/01238

**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n<sup>os</sup>  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Bien que la revendication 37, dans la mesure où elle concerne des méthodes 'in vivo', concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications: elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PL/FR 99/01238

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9745550 A	04-12-1997	AUCUN	
FR 2707664 A	20-01-1995	AU 6905298 A	30-07-1998
		AU 7264694 A	13-02-1995
		BR 9405507 A	25-05-1999
		CA 2144040 A	26-01-1995
		CN 1113390 A	13-12-1995
		CZ 9500639 A	15-11-1995
		EP 0667912 A	23-08-1995
		FI 951138 A	13-04-1995
		WO 9502697 A	26-01-1995
		HU 72558 A	28-05-1996
		JP 8501703 T	27-02-1996
		NO 950939 A	10-03-1995
		NZ 269156 A	26-03-1996
		PL 308122 A	24-07-1995
		SK 31295 A	08-05-1996
		ZA 9405012 A	20-02-1995